

IB99/01621

PCT / IB 99 / 0 1 6 2 1

0 4 . 10 . 99

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 07 OCT 1999

WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application:

1998年10月 9日

出 願 番 号  
Application Number:

平成10年特許願第288103号

出 願 人  
Applicant (s):

ヘキスト・マリオン・ルセル株式会社

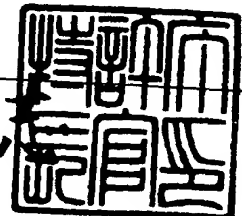
PRIORITY  
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年 5月28日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

山佐 建



出証番号 出証特平11-303512

【書類名】 特許願

【整理番号】 D0J-5136

【提出日】 平成10年10月 9日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C07K 13/10  
A61K 37/02

【発明の名称】 骨誘導因子アンタゴニスト活性を有する成熟型蛋白質

【請求項の数】 10

【発明者】

    【住所又は居所】 埼玉県川越市南台1丁目3番地2 ヘキスト・マリオン  
                                ・ルセル株式会社創薬研究所内

    【氏名】 木村 道夫

【発明者】

    【住所又は居所】 埼玉県川越市南台1丁目3番地2 ヘキスト・マリオン  
                                ・ルセル株式会社創薬研究所内

    【氏名】 勝浦 美枝子

【特許出願人】

    【識別番号】 596124690

    【氏名又は名称】 ヘキスト・マリオン・ルセル株式会社

【代理人】

    【識別番号】 100091731

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 高木 千嘉

    【電話番号】 03-3261-2022

【選任した代理人】

    【識別番号】 100080355

---

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 西村 公佑

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 015565

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9712131

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 骨誘導因子アンタゴニスト活性を有する成熟型蛋白質

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 成熟型ヒトMP52のアミノ酸配列中に存在するメチオニン残基もしくはトリプトファン残基のうちの少なくとも1個の残基を化学修飾により親水性残基に変換するか、あるいは該残基を親水性アミノ酸残基もしくは極性アミノ酸残基で置換することにより得られる骨誘導因子アンタゴニスト活性を有する成熟型蛋白質。

【請求項 2】 前記メチオニン残基の化学修飾が酸化である請求項 1 記載の成熟型蛋白質。

【請求項 3】 前記メチオニン残基の化学修飾がアルキル化である請求項 1 記載の成熟型蛋白質。

【請求項 4】 前記トリプトファン残基の化学修飾がアリールスルフェニル化である請求項 1 記載の成熟型蛋白質。

【請求項 5】 前記成熟型ヒトMP52が配列表配列番号 1 に示すアミノ酸配列を有する蛋白質の二量体である請求項 1 乃至 4 に記載の成熟型蛋白質。

【請求項 6】 成熟型ヒトBMP-2、成熟型ヒトBMP-4または成熟型ヒトBMP-7のアミノ酸配列中に存在するトリプトファン残基の少なくとも1個の残基を、化学修飾により親水性残基に変換するか、あるいは該残基を親水性アミノ酸残基もしくは極性アミノ酸残基で置換することにより得られる骨誘導因子アンタゴニスト活性を有する成熟型蛋白質。

【請求項 7】 成熟型ヒトBMP-2、成熟型ヒトBMP-4または成熟型ヒトBMP-7のアミノ酸配列において、その受容体結合部位を構成する疎水性アミノ酸残基のうち、成熟型ヒトMP52のアミノ酸配列の30番目、71番目および74番目に位置するメチオニン残基に相当する位置の3個の疎水性アミノ酸残基のうち少なくとも1個のアミノ酸残基を親水性アミノ酸残基もしくは極性アミノ酸残基で置換することにより得られる骨誘導因子アンタゴニスト活性を有する成熟型蛋白質。

【請求項 8】 前記成熟型ヒトBMP-2、成熟型ヒトBMP-4または成

熟型ヒト BMP-7 がそれぞれ配列表配列番号 2、3 または 4 に示すアミノ酸配列を有する蛋白質の二量体である請求項 6 または 7 に記載の成熟型蛋白質。

【請求項 9】 請求項 1 乃至 8 のいずれかの項に記載の骨誘導因子アンタゴニスト活性を有する成熟型蛋白質を有効成分とする異所性骨化の治療または予防剤。

【請求項 10】 請求項 1 乃至 8 のいずれかの項に記載の骨誘導因子アンタゴニスト活性を有する成熟型蛋白質を有効成分とする石灰沈着を伴う代謝性疾患の治療または予防剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】

本発明は、骨誘導活性を有する成熟型蛋白質を構成する疎水性アミノ酸の一部残基を化学修飾した成熟型蛋白質あるいは親水性又は極性アミノ酸に置き換えた成熟型蛋白質に関する。本発明の成熟型蛋白質は、骨誘導因子アンタゴニスト様活性を示し、異所性骨形成および異所性石灰沈着又は石灰沈着を伴う骨代謝性疾患、例えば、神経性骨化症、手術侵襲による異所性骨化、外傷性骨化性筋炎、酸素供給不足による骨化、骨原性腫瘍、後縦靱帯骨化症、動脈硬化の症状を抑える医薬品として有用である。

【0002】

【従来の技術】

骨誘導因子 (Bone morphogenetic protein: 以降 BMP と呼ぶ) は、脱灰骨組織に含有される骨誘導活性を有する蛋白質である。1970 年代から精力的に BMP の精製が試みられてきたが、単一の蛋白質としての分離はきわめて困難であった。1989 年にウォズニー (Wozney) らは骨誘導活性のある画分を酵素処理して未知のペプチドを分離してそのアミノ酸配列を手がかりに分子生物学的手法により、BMP と考えられる遺伝子のクローニングに成功した。この遺伝子は直ちに動物培養細胞に導入され、発現した蛋白質の活性がインビボ (in vivo) において確認され、この蛋白質に骨誘導活性が確かにあることが証明された (Wang, E.A. et al., (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol.87, p.2220-2224)。引き続きホ

モロジーを利用した骨誘導活性を有する蛋白質のクローニングが行われ、現在まで骨誘導活性を有する構造の似た複数の蛋白質が発見されている。これらはいずれもTGF（トランスフォーミング成長因子）- $\beta$ スーパーファミリーに属し、基本的に *in vivo* において異所性骨形成を引き起こす活性を有することが確認されている。BMPによる骨形成は内軟骨性といわれており、胎生期の長骨の形成を再現するものと考えられている。したがって、BMPそのものが骨欠損部を補う形での治療薬として利用し得るものである。

#### 【0003】

一方、BMP遺伝子が明らかにされ、その特異的抗体が作成されるようになってから、今まで治療法がなかった異所性石灰化部位にもBMPが発現しており、これらの発症にBMPが関与する可能性が示されるようになってきた。例えば、神経性骨化症、手術侵襲による異所性骨化、外傷性骨化性筋炎、酸素供給不足による骨化、骨原性腫瘍、特定疾患（難病）に指定されている後縦靱帯骨化症（ossification of the posterior longitudinal ligament: 以降 OPLLと呼ぶ）（Spine, 17-3S, S33, 1992）や、動脈硬化石灰化部位（J Clin Invest, vol.91, p.1800, 1993）に、BMPが発現したり含有されたりしていることが近年明らかにされている。また、偽悪性転位骨化症（pseudomalignant heterotopic ossification: 以降 PHOと呼ぶ）、偽悪性骨性腫瘍（pseudomalignant osseous tumor）および限局性骨化性筋炎（myositis ossificans circumscripta）は痛みをともなう筋肉内の硬組織の塊の出現が主な症状である。原因は不明であるが、BMPが患者の筋肉内の硬組織の出現に関与するものと考えられている。これらは、本来は発現しないはずの組織でBMPが発現し、オートクライン（autocrine）に作用して骨が形成されていることを示している。OPLLについては現在のところ有効な治療法もなく、圧迫性の神経症状が重度であれば外科的に切除を試みるが、予後は必ずしも良いものではない。また、動脈の石灰化にしても治療法はない。

#### 【0004】

BMPの発現を抑制することが、これらの病変の治療の主要な手段の一つと推察されるが、それ以外に、例えば、BMPアンタゴニストの投与も有効と考えられる。BMPアンタゴニスト様活性をもつものとしてはBMP受容体やBMPに

対する中和抗体、BMPの結合部位に対応するペプチド、BMPの特定のアミノ酸残基に化学修飾等をほどこしたものなどが考えられる。

#### 【0005】

いままで、BMPの構造活性相関について種々の検討がなされ、成熟型BMPの受容体との結合に関与する部位が推測され、それを基にした合成ペプチドはBMPのアンタゴニストとしてはたらく事が知られている（特願平7-200175号）。

#### 【0006】

##### 【発明が解決しようとする課題】

合成ペプチドの他にも種々の骨・軟骨過形成症等の治療の選択として種類を多くすることが望ましく、本発明の目的は上記の骨関連疾患に有効な治療剤として、新規な化学修飾したまたは遺伝子工学的手法により特定のアミノ酸を置換したBMPアンタゴニスト蛋白質を提供することである。

#### 【0007】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明は、成熟型ヒトMP52のアミノ酸配列中に存在するメチオニン残基もしくはトリプトファン残基の少なくとも1個の残基を、化学修飾により親水性残基に変換するか、あるいは該残基を親水性アミノ酸残基もしくは極性アミノ酸残基で置換することにより得られる骨誘導因子アンタゴニスト活性を有する成熟型蛋白質に関する。

#### 【0008】

さらに本発明は、成熟型ヒトBMP-2、成熟型ヒトBMP-4または成熟型ヒトBMP-7のアミノ酸配列中に存在するトリプトファン残基の少なくとも1個の残基を、化学修飾により親水性残基に変換するか、あるいは該残基を親水性アミノ酸残基もしくは極性アミノ酸残基で置換することにより得られる骨誘導因子アンタゴニスト活性を有する成熟型蛋白質に関する。

#### 【0009】

本発明はさらに、成熟型ヒトBMP-2、成熟型ヒトBMP-4または成熟型ヒトBMP-7のアミノ酸配列において、その受容体結合部位を構成する疎水性

アミノ酸残基のうち、成熟型ヒトMP52のアミノ酸配列の30番目、71番目および74番目に位置するメチオニン残基に相当する位置の3個の疎水性アミノ酸残基のうち少なくとも1個のアミノ酸残基を親水性アミノ酸残基もしくは極性アミノ酸残基で置換することにより得られる骨誘導因子アンタゴニスト活性を有する成熟型蛋白質に関する。

【0010】

本発明は、さらに上記骨誘導因子アンタゴニスト活性を有する成熟型蛋白質を有効成分とする異所性骨化の治療または予防剤に関する。

そして本発明は、さらに骨誘導因子アンタゴニスト活性を有する成熟型蛋白質を有効成分とする石灰沈着を伴う代謝性疾患の治療または予防剤に関する。

【0011】

TGF- $\beta$ スーパーファミリーに属する蛋白質は、その遺伝子構造から生体内では、いずれも前駆体として合成された後、種々のプロセッシングを受け、成熟型のペプチド二量体を形成すると考えられている。ヒトTGF- $\beta$ 1の活性型はC末端側112残基のペプチドの二量体であることが知られている(Nature 316, 701-705, 1985)。本発明において成熟型とは、この活性型ヒトTGF- $\beta$ 1のC末端側112残基と相同性のあるアミノ酸配列のペプチドの二量体を意味する。本発明におけるTGF- $\beta$ スーパーファミリーに属する蛋白質の例としてはBMP-2、BMP-4、BMP-7、ヒトMP52等があげられる。

【0012】

本発明者らは、受容体の結合部位に結合してBMPアンタゴニストとして強く働く化学修飾蛋白質を作る目的でTGF- $\beta$ スーパーファミリーに属し、その中でもBMPファミリーの一員であるヒトMP52に化学修飾およびアミノ酸の置換を試みた。

【0013】

ヒトMP52の活性型は二量体であること、および受容体結合部位は蛋白質分子の外側に露出した部分であると考えられることから、ヒトMP52が二量体を形成したときに隣接する2つのペプチド領域(配列表配列番号1に記載のアミノ酸配列において20番目の Arg から38番目の Ala 及び60番目の Glu から77番目



の Glu まで) が受容体結合部位を形成していると推定した。

【0014】

蛋白質のアミノ酸組成において一般的にトリプトファンとメチオニンは含有率が最も低く選択的な化学修飾に適していること、および推定されたヒトMP52の立体構造モデルから、成熟型ヒトMP52単量体に存在する4つのメチオニン残基のうち3つ(30番目、71番目、74番目)が推定された受容体結合部位に存在することおよび成熟型ヒトMP52単量体に2つ存在するトリプトファン残基の両方(33番目、35番目)が推定された受容体結合部位に存在することから、これら2つのアミノ酸残基に化学修飾を施した蛋白質を作成した。

【0015】

本発明における化学修飾とは、受容体への結合能力をそのままに保ちつつ蛋白質の活性を無効にするに十分な程度にメチオニンまたはトリプトファンの側鎖を変化させることを意味する。この化学修飾には蛋白質化学の研究のために一般的に行われるものが適用される。この方法は、「タンパク質の化学IV」p.6-118, 1977, (社)日本生化学会等に記載されている。メチオニンは疎水性アミノ酸であるが化学修飾によって親水性に変化させることができる。親水性を高めるための化学修飾には、酸化剤を用いたメチオニンのメチオニンスルホキシドあるいはメチオニンスルホンへの酸化と、アルファ-ハロゲノ酢酸を用いたS-カルボキシメチルメチオニン等へのアルキル化がある。メチオニンの酸化剤としては過酸化水素、過ギ酸、過ヨウ素酸、N-クロロスクシンイミド、N-ブロモスクシンイミド等が挙げられる。またアルファ-ハロゲノ酢酸としては、モノヨード酢酸、モノヨード酢酸アミド等が用いられる。

【0016】

トリプトファンについては、そのインドール環に化学修飾を施すことにより、近傍の環境や構造に微妙な変化を与えることができる。好適な例としてp-あるいはo-ニトロフェニルスルフェニルクロライド、2-ニトロ-4-カルボキシフェニルスルフェニルクロライド、2,4-ジニトロフェニルスルフェニルクロライド等によるインドール核2位のアリールスルフェニル化あるいは2-ヒドロキシ-5-ニトロベンジルブロミド、ジメチル(2-ヒドロキシ-5-ニトロベ

ンジル) スルホニウムブロミド等によるインドール核 3 位への 2-ヒドロキシ-5-ニトロベンジル基の付加等が挙げられる。

【0017】

本発明は特に配列表配列番号 1 に示す成熟型ヒト MP 5 2 アミノ酸配列におけるメチオニン残基のうち 1 ないし 4 個のメチオニン残基あるいはトリプトファン残基の 1 ないし 2 個に化学修飾を施した成熟型蛋白質に関する。

【0018】

配列表配列番号 1 に示す蛋白質は特開平 8-531621 号に記載の方法で製造することが出来る。この方法によって製造された成熟型ヒト MP 5 2 の受容体結合部位において構成アミノ酸のメチオニン残基の 4 個のうち 3 個が存在していること、および構成アミノ酸のトリプトファン残基のうち 2 個ともが存在し、かつこれらアミノ酸が疎水性であることから、これらの疎水性アミノ酸が骨誘導活性に重要な役割していることが考えられる。

【0019】

本発明の成熟型ヒト MP 5 2 には、配列表配列番号 1 に示すアミノ酸配列の成熟型蛋白質の他に、その N 末端に Ala もしくは Arg-Ala が結合したアミノ酸配列の成熟型蛋白質を含む。

【0020】

他の骨誘導因子例えばヒト BMP-2、ヒト BMP-4、ヒト BMP-7 等の成熟型蛋白質とヒト MP 5 2 成熟型蛋白質のアミノ酸配列を比較するとメチオニン残基に位置するアミノ酸はすべてメチオニン残基か疎水性アミノ酸である。

【0021】

具体的には成熟型ヒト BMP-2 の受容体結合部位は配列表配列番号 2 に記載のアミノ酸配列 (Science 242 (4885), 1528-1534, 1988) において 16 番目の Arg から 34 番目の Ala 及び 56 番目の Asn から 73 番目の Lys までのペプチドと予測され、成熟型ヒト MP 5 2 のメチオニン (30 番目、71 番目、74 番目) に相当するアミノ酸の位置は 26 番目のバリン、67 番目のバリン、70 番目のバリンに置換されている。

【0022】

成熟型ヒトBMP-4の受容体結合部位は配列表配列番号3に記載のアミノ酸配列(DNA Seq. 5 (5), 272-275, 1995)において19番目のArgから37番目のAla及び59番目のAsnから76番目のSerまでのペプチドと予測され、成熟型ヒトMP52のメチオニン(30番目、71番目、74番目)に相当するアミノ酸の位置は29番目のバリン、70番目のバリン、73番目のバリンに置換されている。

【0023】

成熟型ヒトBMP-7の受容体結合部位は配列表配列番号4に記載のアミノ酸配列(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93 (2), 878-883, 1996)で40番目のLysから58番目のAla及び80番目のAsnから97番目のGluまでのペプチドと予測され、成熟型ヒトMP52のメチオニン(30番目、71番目、74番目)に相当するアミノ酸の位置は50番目のロイシン、91番目のバリン、94番目のイソロイシンに置換されている。

【0024】

これらの成熟型ヒトMP52のメチオニンに相当するアミノ酸に位置する疎水性アミノ酸の化学修飾は選択的な修飾は困難であるが、遺伝子工学的手法を用い疎水性から親水性又は極性アミノ酸に変換することは可能である。

【0025】

またトリプトファン残基は上述の骨誘導因子すべてで保存されていることから、化学修飾法でも遺伝子工学的手法でも疎水性アミノ酸から親水性又は極性アミノ酸に置換することが可能である。トリプトファン残基は化学修飾および遺伝子工学においてその立体構造に変化を起こさせる点でも重要な役割をもつ。

【0026】

従って、本発明は成熟型ヒトMP52、特に配列表配列番号1に示すアミノ酸配列のメチオニン残基のうち1ないし4個のメチオニン残基あるいはトリプトファン残基の1ないし2個をを遺伝子工学的手法を用いることにより親水性アミノ酸又は極性アミノ酸に変換した成熟型蛋白質に関する。本発明において、親水性のアミノ酸や極性アミノ酸とはアスパラギン酸、グルタミン酸、リジン、アルギニン、ヒスチジン、セリン、スレオニン残基等をいう。本発明においてメチオニ

ン残基あるいはトリプトファン残基を他の親水性又は極性アミノ酸に組み換える場合、メチオニン残基においては配列表配列番号 1 に記載する 30 番目、71 番目、74 番目および 111 番目のメチオニンに相当するコドンのアスパラギン酸、グルタミン酸、リジン、アルギニン、ヒスチジン、セリン、スレオニンなどのコドンに換え換えた組み換え DNA あるいはトリプトファン残基においては 32 番目、35 番目のトリプトファンに上記アミノ酸に相当するコドンに組み換えた組換え DNA を導入し大腸菌に発現させ本発明の蛋白質を得ることができる。

## 【0027】

また、本発明は、配列表配列番号 2 から 4 に示されるアミノ酸配列の成熟型蛋白質のうちいずれかにおいて、トリプトファン残基の 1 ないし 2 個に化学修飾を施した成熟型蛋白質に関する。

## 【0028】

本発明はさらに配列表配列番号 2 から 4 に示されるアミノ酸配列の成熟型蛋白質のうちいずれかにおいて、その受容体結合部位を構成する疎水性アミノ酸のうち、配列表配列番号 1 の 30 番目、71 番目および 74 番目に位置するメチオニン残基に相当する位置の疎水性アミノ酸のうち 1 ないし 3 個のアミノ酸残基あるいはトリプトファン残基の 1 ないし 2 個を親水性アミノ酸又は極性アミノ酸に置換した成熟型蛋白質に関する。本発明における疎水性アミノ酸とはメチオニン、バリン、ロイシン、イソロイシンあるいはトリプトファンをいう。

## 【0029】

本発明は配列表配列番号 1 に記載のアミノ酸配列を有する成熟型蛋白質において、それを構成するメチオニン残基の 1 ないし 4 個のメチオニン残基を酸化した成熟型蛋白質に関する。詳細にはメチオニン残基を酸化する場合、2 mg/ml の濃度の成熟型蛋白質に、終濃度が 0.014 % となるように過酸化水素を添加し、室温にて 15 時間以上反応させるメチオニン残基がメチオニンスルホキシド化された成熟型蛋白質を得ることができる。

## 【0030】

本発明は配列表配列番号 1 に記載のアミノ酸配列を有する成熟型蛋白質において、それを構成するメチオニン残基の 1 ないし 4 個のメチオニン残基をアルキル

化した成熟型蛋白質に関する。詳細には、2 mg/mlの濃度の蛋白質に、メチオニン残基の50～100倍のモル比のモノヨード酢酸を添加し、室温にて15時間以上反応させ、メチオニン残基がS-カルボキシメチル化された成熟型蛋白質を得ることができる。

【0031】

本発明は配列表配列番号1に記載のアミノ酸配列を有する成熟型蛋白質において、それを構成するトリプトファン残基のうち1ないし2個のトリプトファン残基をアリールスルフェニル化した成熟型蛋白質に関する。詳しくは、2 mg/mlの濃度の蛋白質に、100%酢酸に溶解したp-ニトロフェニルスルフェニルクロライドを20当量添加し、室温にて1時間反応させ、トリプトファン残基がアリールスルフェニル化された成熟型蛋白質を得ることができる。

【0032】

本発明は配列表配列番号2に記載のアミノ酸配列の28番目、31番目のトリプトファン残基の1個あるいは2個をアリールスルフェニル化した成熟型蛋白質に関する。

【0033】

本発明は配列表配列番号2に記載のアミノ酸配列の26番目、67番目、70番目のバリンのいずれかまたは全部あるいは28番目、31番目のトリプトファン残基の1個あるいは2個をアスパラギン酸、グルタミン酸、リジン、アルギニン、ヒスチジン、セリン、スレオニン等に置換した成熟型蛋白質に関する。

【0034】

本発明は配列表配列番号3に記載のアミノ酸配列の31番目、34番目のトリプトファン残基の1個あるいは2個をアリールスルフェニル化した成熟型蛋白質に関する。

【0035】

本発明は配列表配列番号3に記載のアミノ酸配列の29番目、70番目、73番目のバリンのいずれかまたは全部あるいは31番目、34番目のトリプトファン残基の1個あるいは2個をアスパラギン酸、グルタミン酸、リジン、アルギニン、ヒスチジン、セリン、スレオニン等に置換した成熟型蛋白質に関する。

【0036】

本発明は配列表配列番号4に記載のアミノ酸配列の52番目、55番目のトリプトファン残基の1個あるいは2個をアリールスルフェニル化した成熟型蛋白質に関する。

【0037】

本発明は配列表配列番号4に記載のアミノ酸配列の50番目のロイシン、91番目のバリン、94番目のイソロイシン、131番目のメチオニンのいずれかまたは全部あるいは52番目、55番目のトリプトファン残基の1個あるいは2個をアスパラギン酸、グルタミン酸、リジン、アルギニン、ヒスチジン、セリン、スレオニン等に置換した成熟型蛋白質に関する。

【0038】

本発明の化学修飾あるいは他のアミノ酸で置換された蛋白質のBMPアンタゴニスト様作用は、児玉ら (Kodama, H. et al. (1981) Jpn. J. Oral Biol., vol. 23, p.899) によりマウス頭蓋冠から単一株化された骨芽細胞様の性質を有するMC3T3-E1細胞株に添加培養し、細胞中のアルカリホスファターゼ (ALPase) を指標として生物活性を測定することにより証明され得る。ALPaseは骨芽細胞および軟骨細胞の分化・成熟の指標酵素としてしばしば用いられる (Pfeilschifter, J., et al., Endocrinology (1987), vol. 121, p 212-218; Rodan, G.A., et al., calcium regulating hormones and bone metabolism, Elsevier Science Publishers B.V., (1992), p 183-196)。

【0039】

本発明の実施例1から3で得られた成熟型蛋白質は骨芽細胞様の性質を有するMC3T3-E1細胞株やC3H10T<sup>1</sup>/<sub>2</sub>細胞株の組換え成熟型ヒトBMP-2 (rh-BMP-2) や成熟型ヒトMP52により誘導されたALPase活性の上昇を用量依存的に抑制した。このことは、本発明蛋白質がヒトMP52の活性のみならず他のBMP蛋白質の活性を抑えることを示している。

【0040】

本発明は上記で得られたいずれかの蛋白質を有効成分とする異所性骨化の治療および予防剤に関する。

さらに本発明は上記で得られたいずれかの蛋白質を有効成分とする石灰沈着を伴う代謝性疾患の治療および予防剤に関する。

【0041】

本発明の化学修飾蛋白質は、OPLLや動脈硬化の症状の進行を抑える薬剤及びBMPが発現している骨や軟骨の腫瘍の治療、その他骨代謝疾患の治療剤として有用である。その投与方法としては静脈内及び筋肉内投与が可能であり、静脈内投与の場合は通常の静脈内注射の他点滴静注が可能である。

【0042】

注射用製剤としては、例えば注射用粉末製剤とすることができる。その場合は、適当な水溶性賦形剤、例えばマンニトール、ショ糖、乳糖、マルトース、ブドウ糖、フルクトース糖の1種又は2種以上を加えて水で溶解し、バイアル又はアンプルに分注した後、凍結乾燥し、密封して製剤とすることができる。

臨床における成人1日当たりの投与量は、投与方法、患者の年齢、体重、症状等によって異なるが、通常は本蛋白質として0.01～5mgの範囲である。

以下に実施例により、本発明を詳述する。なお、本発明はこれらの実施例により限定されるものではない。

【0043】

【実施例】

実施例1 メチオニン残基を酸化したヒトMP52成熟型蛋白質の作成

(1) 過酸化水素による成熟型ヒトMP52のメチオニン残基の酸化(メチオニンスルホキシドへの変換)

2mM EDTA-10mM塩酸に溶解した2mg/mlの濃度の成熟型ヒトMP52に、終濃度が0.014%となるように過酸化水素を添加し、室温にて15時間以上反応させた。

(2) メチオニン酸化成熟型ヒトMP52の分離

配列表配列番号1に記載のアミノ酸配列を有する成熟型ヒトMP52(以下未修飾成熟型ヒトMP52と記す)とメチオニン酸化成熟型ヒトMP52は、逆相HPLCを用いて両者の保持時間の違いにより分離した。酸化を受けることによってタンパク質の親水性が増し、逆相HPLCにおける保持時間は、メチオニ

ン酸化成熟型ヒトMP 52の方が、早くなる。分離条件は、以下の通りである。カラムは、Nucleosil 5-C18-300カラム (4.6mm I.D.×150mm, GL Science社製) を用い、流速を1分間あたり1.3 mlに設定、カラム温度45℃、ピーク検出波長として214 nm及び280 nmを用いた。溶媒は、A液として0.05% TFAを含む水、B液として0.05% TFAを含むアセトニトリルを用いて、B液25%から45%までの80分間の直線勾配で溶出を行った。HPLCポンプは、HP 1050 (HEWLETT PACKARD) を用いた。

この条件で、未修飾成熟型ヒトMP 52が51分付近で溶出するのに対し、メチオニン酸化成熟型ヒトMP 52は、これより早く47分付近で溶出し、両者は容易に分離できた。

#### 【0044】

#### (3) メチオニン残基の酸化の確認

未修飾成熟型ヒトMP 52及びメチオニン酸化成熟型ヒトMP 52のトリプシン消化フラグメントの逆相カラムクロマトグラフィにおける溶出パターンを比較することによって、メチオニン残基の酸化の確認を行なった。

未修飾成熟型ヒトMP 52は配列表配列番号1に示すごとく、システイン残基を7つ持つ。7つのうち6つが3組のジスルフィド結合を形成し、残りの1つのシステインで二量体を形成している。十分な酵素消化のためには、ジスルフィド結合をはずし、再結合を阻害するためのSH基のブロックが必要となる。このため、トリプシン消化の前に、ジチオスレイトールを用いてジスルフィド結合を還元後、システイン残基をアルキル化 (S-カルボキシルメチル化) する処理を行なった。

まず、凍結乾燥した未修飾成熟型ヒトMP 52及びメチオニン酸化成熟型ヒトMP 52をそれぞれ終濃度1 mg/mlとなるように8 M尿素-0.2 M重炭酸アンモニウム-2 mM EDTA、pH 8.5の溶液に溶かし、システイン残基の50倍量のジチオスレイトール (DTT) を加えて50℃で30分反応させた。ここに、

システイン残基の250倍量のモノヨード酢酸アミドを加え、遮光して30分反応させることにより、還元アルキル化未修飾成熟型ヒトMP 52及び還元アルキル化メチオニン酸化成熟型ヒトMP 52を得た。この溶液を水で4倍に希釈し尿



素の終濃度を2Mとした後、成熟型ヒトMP52の重量あたり1/50量のトリプシンを加え、37℃で18時間消化を行なった。このトリプシン消化物を逆相HPLCカラムにかけ、すべてのフラグメントを分離した。分離条件は、以下の通りである。カラムは、Nucleosil 5-C18-300カラム(4.6mm I.D.×150mm, GL Science社製)を用い、流速を1分間あたり1.3mlに設定、カラム温度45℃、ピーク検出波長として214nmを用いた。溶媒は、A液として0.05% TFAを含む水、B液として0.05% TFAを含むアセトニトリルを用いて、5分間B液0%に維持した後、0%から45%までの90分間の直線勾配で溶出を行った。HPLCポンプは、HP1050 (HEWLETT PACKARD)を用いた。

次に、分離した還元アルキル化未修飾成熟型ヒトMP52及び還元アルキル化メチオニン酸化成熟型ヒトMP52の各消化フラグメントについての1次構造上の位置を決定するためにアミノ酸組成分析を行なった。アミノ酸組成分析の操作は主として続生化学実験講座(東京化学同人)第2巻、タンパク質の化学(上)第4章記載の方法に従った。以下、簡単に操作を記す。加水分解は、0.1%フェノールを含む6N塩酸の蒸気下、Waters社のPICO.TAG.WORK STATIONを用いて、110℃、21時間行なった。その後、ピラス社のAmino acid standard Hを標準アミノ酸として用い、PTC化法によるアミノ酸組成分析を行なった。

PTC-アミノ酸の分離に用いたのは、Waters社の510HPLCポンプ、カラムは、和光純薬のWakopak WS-PTC(4.0mm I.D.×200mm)、溶媒はPTCアミノ酸溶離液A及びPTCアミノ酸溶離液B(共に和光純薬)である。

アミノ酸組成分析により1次構造上の位置が決定された還元アルキル化未修飾成熟型ヒトMP52及び還元アルキル化メチオニン酸化成熟型ヒトMP52の各トリプシンフラグメントの逆相HPLCカラムクロマトグラフィにおける溶出時間を比較した。還元アルキル化メチオニン残基を含む成熟型ヒトMP52のトリプシンフラグメントは、配列表配列番号1に示す29番目から56番目に対応するもの(29-56、30番目のメチオニンを含む)、配列表配列番号1に示す57番目から88番目に対応するもの(57-88、71及び74番目のメチオニンを含む)及び配列表配列番号1に示す107番目から119番目に対応するもの(107-119、111番目のメチオニンを含む)の3種類で、還元アルキル化未修飾成熟型ヒト

MP52由来のそれぞれのフラグメントの溶出時間が、順に84分、62分、36分付近であるのに対し、還元アルキル化メチオニン酸化成熟型ヒトMP52由来のフラグメントは、順に80分、48分、31分付近で、還元アルキル化未修飾成熟型ヒトMP52由来のフラグメントより早く溶出した。

一方、これ以外のメチオニンを含まないフラグメントの溶出時間は両者で変化がなかった。以上により、メチオニン残基特異的に酸化反応がおきていることが確認できた。

#### 【0045】

実施例2 メチオニン残基をS-カルボキシメチル化したヒトMP52成熟型蛋白質の作成

(1) モノヨード酢酸による成熟型ヒトMP52のメチオニン残基のアルキル化

モノヨード酢酸を用いたアルキル化反応は、ジスルフィド結合をしていないシステイン残基のSH基に最も反応性が高いが、前述したように、未修飾成熟型ヒトMP52のシステイン残基はすべてジスルフィド結合をしているため、酸性条件においては、アルキル化反応はほぼ選択的にメチオニン残基に起きる。よって、以下のように操作を行なった。10mM塩酸に溶解した2mg/mlの濃度の未修飾成熟型ヒトMP52に、メチオニン残基の50～100倍のモル比のモノヨード酢酸を添加し、室温にて3～18時間反応させた。

(2) メチオニン残基をアルキル化した成熟型ヒトMP52の分離

未修飾成熟型ヒトMP52とメチオニンアルキル化成熟型ヒトMP52は、逆相HPLCを用いて両者の保持時間の違いにより分離した。分離条件（使用カラム、流速、温度、検出波長およびHPLCポンプ）は実施例1(2)と同様である。溶媒は、A液として0.05%TFAを含む水、B液として0.05%TFAを含むアセトニトリルを用いて、5分後からの60分間でB液30%から45%まで直線勾配を行なった。

この条件で、未修飾成熟型ヒトMP52が38分付近で1つのピークとして溶出するのに対し、アルキル化成熟型ヒトMP52は、未修飾成熟型ヒトMP52の溶出時間である38分付近のピークの他にこれよりも溶出時間の早いピークが

4 本（溶出時間；36分、34分、32分、29分）確認できた。反応が進むほど、すなわちアルキル化されたメチオニンの数が増すほど溶出時間が早くなる。これらピークを分取し、その確認のために実施例 1（3）と同様にアミノ酸組成分析を行なった。アミノ酸組成分析において、アルキル化されたメチオニンは加水分解で壊れないため、反応していないメチオニンとは別のピークとして検出される。すなわち、反応の進行程度はメチオニンピークの減少によって確認できる。

これにより、溶出時間 29 分のピークはメチオニン 4 つすべてがアルキル化したもの、溶出時間 32 分のピークはメチオニン 3 つがアルキル化したもの、溶出時間 34 分のピークはメチオニン 2 つがアルキル化したもの、溶出時間 36 分のピークはメチオニン 1 つがアルキル化したものであることがわかった。また、未修飾成熟型ヒト MP 52 の溶出時間である 38 分付近のピークは、アルキル化されていないことがわかった。これらすべてのピークについて、メチオニン以外のアミノ酸については、成熟型ヒト MP 52 のアミノ酸組成の理論値と一致した。以上により、メチオニン残基特異的にアルキル化反応がおきていること、分離したピークは、アルキル化反応の進行程度の違うものであることが確認できた。

#### 【0046】

##### （3）メチオニン残基のアルキル化の確認

未修飾成熟型ヒト MP 52 及びメチオニンアルキル化成熟型ヒト MP 52 のトリプシン消化フラグメントの逆相カラムにおける溶出パターンを比較することによって、メチオニン残基のアルキル化の確認を行なった。

実施例 1（3）と同様に、トリプシン消化の前に、ジチオスレイトールを用いてジスルフィド結合を還元後、システイン残基をアルキル化する処理を行なった。ただし、メチオニンのアルキル化反応にモノヨード酢酸を用いた S-カルボキシメチル化を行なっているため、モノヨード酢酸アミドを用いた実施例 1 と同様の S-カルボキシメチル化ではなく、アルキル化試薬として 4-vinyl pyridine を用いた S-ピリジルエチル化を行なった。アルキル化反応は、pH 8.5 においては還元したシステインにほぼ選択的でメチオニンには殆ど起きないが、副反応があった場合に区別し得るためである。

まず、凍結乾燥した未修飾成熟型ヒト MP 52 及びメチオニンアルキル化成熟

型ヒトMP 52を終濃度1 mg/mlとなるように6 M Guanidine-HCl-0.4 M トリス塩酸緩衝液、pH 8.5の溶液に溶かし、システイン残基の50倍量のジチオスレイトール (DTT) を加えて50℃で30分反応させた。ここに、システイン残基の250倍量の4-vinyl pyridineを加え、遮光して30分反応させた。この溶液を、6 M Guanidine-HCl-0.4 M トリス塩酸緩衝液、pH 8.5の溶液にて平衡化させてある脱塩用のゲルろ過カラム (PD-10、ファルマシア) にかけて過剰の試薬を除いた後、逆相HPLCカラム (Cosmasil 10C18-300、4.6mm I.D.×100mm、ナカライテスク) にて分離した。分光光度計で、トリプトファンに由来する280nmにおける吸収とピリジンに由来する254nmにおける吸収を併せ持つ分画を確認した。

その後、実施例1(3)と同様にトリプシン消化を行ない、消化フラグメントの分離を行なった。

次に、実施例1(3)と同様にして、アミノ酸組成分析により各フラグメントの1次構造上の位置を決定した。

アミノ酸組成分析により1次構造上の位置が決定された未修飾成熟型ヒトMP 52及びメチオニナルキル化成熟型ヒトMP 52の各トリプシンフラグメントの逆相HPLCカラムにおける溶出時間を比較した。メチオニン残基を含む成熟型ヒトMP 52のトリプシンフラグメントは、配列表配列番号1に示す29番目から56番目に対応するもの (29-56、30番目のメチオニンを含む)、配列表配列番号1に示す57番目から88番目に対応するもの (57-88、71及び74番目のメチオニンを含む) 及び配列表配列番号1に示す107番目から119番目に対応するもの (107-119、111番目のメチオニンを含む) の3種類で、未修飾成熟型ヒトMP 52由来のそれぞれのフラグメントの溶出時間が、順に77分、58分、36分付近であるのに対し、メチオニナルキル化成熟型ヒトMP 52由来のフラグメントは、順に74分、42分、30分付近で、未修飾成熟型ヒトMP 52由来のフラグメントより早く溶出した。一方、これ以外のメチオニンを含まないフラグメントの溶出時間は両者で変化がなかった。

また、アミノ酸組成分析において、溶出時間に変化の見られたメチオニナルキル化成熟型ヒトMP 52由来のメチオニンを含むフラグメントのメチオニン数

だけが理論値と違っていた。さらに、Applied Biosystem社のシーケンサー (Model 476A) を用い、これらフラグメントのN末シーケンス分析も行ない、メチオニン残基特異的にアルキル化反応がおきていることが確認できた。

【0047】

実施例3 トリプトファン残基をアリールスルフェニル化した成熟型ヒトMP5  
2の作成

(1) p-ニトロフェニルスルフェニルクロライドによる成熟型ヒトMP52のトリプトファン残基のアリールスルフェニル化

50%酢酸に溶解した2mg/mlの濃度の未修飾成熟型ヒトMP52に、100%酢酸に溶解したp-ニトロフェニルスルフェニルクロライドを20当量添加し、室温にて1時間反応させた。

(2) アリールスルフェニル化成熟型ヒトMP52の分離

逆相HPLCにおける溶出の保持時間の違いにより分離した。アリールスルフェニル化によって疎水性が増すことから、アリールスルフェニル化成熟型ヒトMP52の逆相HPLCにおける溶出時間は、未修飾成熟型ヒトMP52に比べて遅くなる。分離条件は、以下の通りである。使用カラム、流速、およびHPLCポンプは実施例1(2)と同様で、カラム温度40℃、ピーク検出波長として214nm及び365nmを用いた。溶媒は、A液として0.05%TFAを含む水、B液として0.05%TFAを含むアセトニトリルを用いて、B液25%で5分間維持した後、その後の35分間でB液25%から60%までの直線勾配で溶出を行った。この条件で、未修飾成熟型ヒトMP52が22分付近で溶出するのに対し、トリプトファンをアリールスルフェニル化した成熟型ヒトMP52は、これより遅く26分付近で溶出し、両者は容易に分離できた。

(3) トリプトファン残基のアリールスルフェニル化の確認

実施例1に記した方法と同様の方法で、ジスルフィド結合を還元後、システイン残基をアルキル化(S-カルボキシル化)した未修飾成熟型ヒトMP52及びトリプトファン残基のアリールスルフェニル化成熟型ヒトMP52をトリプシン消化後C18逆相カラムで消化フラグメントを分離し、アミノ酸組成分析により各フラグメントの1次構造上の位置を決定した。

トリプトファン残基を含む成熟型ヒトMP52のトリプシンフラグメントは、配列表配列番号1に示す29番目から56番目に対応するもの(29-56、32番目及び35番目のトリプトファンを含む)のみである。トリプトファン残基を含むトリプトファン残基のアリールスルフェニル化成熟型ヒトMP52由来のフラグメントの溶出時間(95分付近)のみが、未修飾成熟型ヒトMP52由来のフラグメントの溶出時間(84分付近)に比べて遅くなっていた。一方、これ以外のトリプ

トファンを含まないフラグメントの溶出時間は両者で変化がなかった。また、N末シーケンス分析によってもトリプトファンのみが未修飾と修飾成熟型ヒトMP52で違うことから確認できた。

【0048】

#### 実施例4 骨誘導活性抑制の検定

本発明の成熟型蛋白質のBMP-2アンタゴニスト様作用は、児玉ら（前述）によるマウス頭蓋冠から単一株化された骨芽細胞様の性質を有するMC3T3-E1細胞株、および未分化細胞であるが、培養条件により骨芽細胞、軟骨細胞、筋細胞、脂肪細胞などに分化する多分化能を持つC3H10T<sup>1/2</sup>細胞株に添加培養することにより検定された。本細胞株の培養は、多久和ら（前述）による記載の方法に準じて行った。MC3T3-E1細胞株の場合、1cm<sup>2</sup>当たり5×10<sup>3</sup>細胞の密度に調製された細胞を播き、10%牛胎児血清を含むα-MEM培地中で3日間前培養を行った。α-MEM培地で細胞を洗った後、0.3%牛血清アルブミンを含む無血清α-MEM培地に交換した。ここに種々の濃度の本発明の成熟型蛋白質及び成熟型rh-BMP-2（リコンビナントヒトBMP-2）を添加し、さらに3日間培養（後培養）を行った。細胞中のALPase活性は、p-ニトロフェニルリン酸を基質として用いる比色法により定量した。

C3H10T<sup>1/2</sup>細胞株の場合は、前培養に用いた培地が10%牛胎児血清を含むBME培地であり、後培地に用いた培地が2%牛胎児血清を含むBME培地である他は、MC3T3-E1細胞株の条件と同様である。

MC3T3-E1細胞株中のALPase活性について、実施例2において逆相HPLCにおける保持時間の違いにより得られたメチオニン残基アルキル化成熟型ヒトMP52の各分画と未修飾成熟型ヒトMP52の逆相分画とを比較した結果を図1に示す。図中の黒丸実線は未修飾成熟型ヒトMP52の逆相分画を、黒四角実線は1個のメチオニン残基がアルキル化されたもの、黒三角破線は2個のメチオニン残基がアルキル化されたものを、白抜き丸実線は3個のメチオニン残基がアルキル化されたものを、白抜き三角点線は4個のメチオニン残基がアルキル化されたものをそれぞれ表わしている。X軸の0上に示してある黒丸は、薬物を添加していない細胞の活性を示している。図1に示すごとく、メチオニンの

アルキル化反応進行に連れ、MC3T3-E1細胞株中のALPase活性促進作用が減少した。

図2は細胞株の違いによるメチオニン残基を酸化した成熟型ヒトMP52およびトリプトファン残基をアリールスルフェニル化した成熟型ヒトMP52のアンタゴニスト様活性を示した図である。図2(A)は、C3H10T<sup>1</sup>/<sub>2</sub>細胞株における成熟型rh-BMP-2に対するアンタゴニスト様活性、図2(B)は、MC3T3-E1細胞株における成熟型ヒトMP52に対するアンタゴニスト様活性をそれぞれ表わしている。図中における黒丸実線トリプトファン残基をアリールスルフェニル化した成熟型ヒトMP52を、白抜き丸点線はメチオニン残基を酸化した成熟型ヒトMP52を、黒四角は図2(A)ではメチオニン残基を酸化した成熟型ヒトMP52未添加の300ng/mlの成熟型rh-BMP-2単独のALPase活性(C3H10T<sup>1</sup>/<sub>2</sub>細胞株)、図2(B)では600ng/mlの未修飾成熟型ヒトMP52単独のALPase活性(MC3T3-E1細胞株)を示す。また、白抜き四角は薬物未添加の活性を示している。

図2(A)に示すごとく、300ng/mlの成熟型rh-BMP-2はC3H10T<sup>1</sup>/<sub>2</sub>細胞株中のALPase活性を非添加対照群の約40倍に上昇させた。

本発明の成熟型ヒトMP52は1当量から20当量において用量依存的にそのALPase活性の上昇を抑制した。また、図2(B)に示すごとく、600ng/mlの未修飾成熟型ヒトMP52はMC3T3-E1細胞株中のALPase活性を非添加対照群の約3倍に上昇させた。本発明のアミノ酸修飾成熟型ヒトMP52は1当量から10当量において用量依存的にそのALPase活性の上昇を抑制した。

【0049】

【発明の効果】

本発明の蛋白質は異所性骨化や動脈硬化の症状の進行を抑える医薬品として利用できる。そのほかBMPを発現している骨や軟骨の腫瘍の治療、OPPL以外  
の靱帯や骨周辺の軟部組織の骨化を防止するために使用することが可能である。  
また、骨代謝回転の高まっている状態、たとえばページェット病に対し使用することにより、骨芽細胞の機能を低下させ症状の進行を抑えられる。また、BMP



から出発したペプチドや低分子化合物で、BMPとその受容体の結合に競合するような薬物のスクリーニングや評価系における試薬としても有用である。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Hoechst Marion Roussel Ltd.

<120> BMP antagonist

<130>

<140>

<141>

<150>

<151>

<160> 4

<210> 1

<211> 119

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<223> Human MP52 mature protein; 30th, 71st, 74th and 111th Met are modified to methionine sulfoxide, methionine sulfone, s-carboxymethyl (s-carboxamidemethyl) methionine or substituted to Glx, Asx, Lys His, Arg, Thr or Ser. 32nd and 34th Trp are modified to allylsulphenyl Trp or substituted to Glx, Asx, Lys His, Arg, Thr or Ser.

---

<400>

Pro Ser Ala Thr Arg Gln Gly Lys Arg Pro Ser Lys Asn Leu Lys Ala

1	5	10	15
Arg Cys Ser Arg Lys Ala Leu His Val Asn Phe Lys Asp Met Gly Trp			
20	25	30	
Asp Asp Trp Ile Ile Ala Pro Leu Glu Tyr Glu Ala Phe His Cys Glu			
35	40	45	
Gly Leu Cys Glu Phe Pro Leu Arg Ser His Leu Glu Pro Thr Asn His			
50	55	60	
Ala Val Ile Gln Thr Leu Met Asn Ser Met Asp Pro Glu Ser Thr Pro			
65	70	75	80
Pro Thr Cys Cys Val Pro Thr Arg Leu Ser Pro Ile Ser Ile Leu Phe			
85	90	95	
Ile Asp Ser Ala Asn Asn Val Val Tyr Lys Gln Tyr Glu Asp Met Val			
100	105	110	
Val Glu Ser Cys Gly Cys Arg			
115			

<210> 2

<211> 114

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<223> Human BMP-2 mature protein; 26th, 67st and 70th Val are substituted to Glx, Asx, Lys His, Arg, Thr or Ser. 28th and 31st Trp are modified to allylsulphenyl Trp or substituted to Glx, Asx, Lys, His, Arg, Thr or Ser.

<400>

Gln Ala Lys His Lys Gln Arg Lys Arg Leu Lys Ser Ser Cys Lys Arg
1 5 10 15
His Pro Leu Tyr Val Asp Phe Ser Asp Val Gly Trp Asn Asp Trp Ile

[illegible]

<210> 3

&lt;211&gt; 117

&lt;212&gt; PRT

◁213▷ Homo sapiens

<223> Human BMP-4 mature protein; 29th, 70st, 73rd Val are substituted to Glx, Asx, Lys His, Arg, Thr or Ser. 31st and 34th Trp are modified to allylsulphenyl Trp or substituted to Glx, Asx, Lys His, Arg, Thr or Ser.

<400>

Arg Ser Pro Lys His His Ser Gln Arg Ala Arg Lys Lys Asn Lys Asn

1                  5                  10                  15

Cys Arg Arg His Ser Leu Tyr Val Asp Phe Ser Asp Val Gly Trp Asn

20                      25                      30

Asp Trp Ile Val Ala Pro Pro Gly Tyr Gln Ala Phe Tyr Cys His Gly

35	40	45
Asp Cys Pro Phe Pro Leu Ala Asp His Leu Asn Ser Thr Asn His Ala		
50	55	60
Ile Val Gln Thr Leu Val Asn Ser Val Asn Ser Ser Ile Pro Lys Ala		
65	70	75
Cys Cys Val Pro Thr Glu Leu Ser Ala Ile Ser Met Lys Tyr Leu Asp		
85	90	95
Glu Tyr Asp Lys Val Val Leu Lys Asn Tyr Gln Glu Met Val Val Glu		
100	105	110
Gly Cys Gly Cys Arg		
115		

<210> 4

<211> 139

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<223> Human BMP-7 mature protein; 50th Leu, 91st Val and 94th Ile are substituted to Glx, Asx, Lys, His, Arg, Thr or Ser. 52nd and 55th Trp are modified to allylsulphenyl Trp or substituted to Glx, Asx, Lys His, Arg, Thr or Ser.

<400>

Ser Thr Gly Ser Lys Gln Arg Ser Gln Asn Arg Ser Lys Thr Pro Lys
1                      5                      10                      15
Asn Gln Glu Ala Leu Arg Met Ala Asn Val Ala Glu Asn Ser Ser Ser
20                      25                      30
Asp Gln Arg Gln Ala Cys Lys Lys His Glu Leu Tyr Val Ser Phe Arg
35                      40                      45

Asp	Leu	Gly	Trp	Gln	Asp	Trp	Ile	Ile	Ala	Pro	Glu	Gly	Tyr	Ala	Ala
50						55						60			
Tyr	Tyr	Cys	Glu	Gly	Glu	Cys	Ala	Phe	Pro	Leu	Asn	Ser	Tyr	Met	Asn
65					70					75				80	
Ala	Thr	Asn	His	Ala	Ile	Val	Gln	Thr	Leu	Val	His	Phe	Ile	Asn	Pro
				85					90					95	
Glu	Thr	Val	Pro	Lys	Pro	Cys	Cys	Ala	Pro	Thr	Gln	Leu	Asn	Ala	Ile
			100					105					110		
Ser	Val	Leu	Tyr	Phe	Asp	Asp	Ser	Ser	Asn	Val	Ile	Leu	Lys	Lys	Tyr
			115					120					125		
Arg	Asn	Met	Val	Val	Arg	Ala	Cys	Gly	Cys	His					
			130					135							

## 【図面の簡単な説明】

## 【図 1】

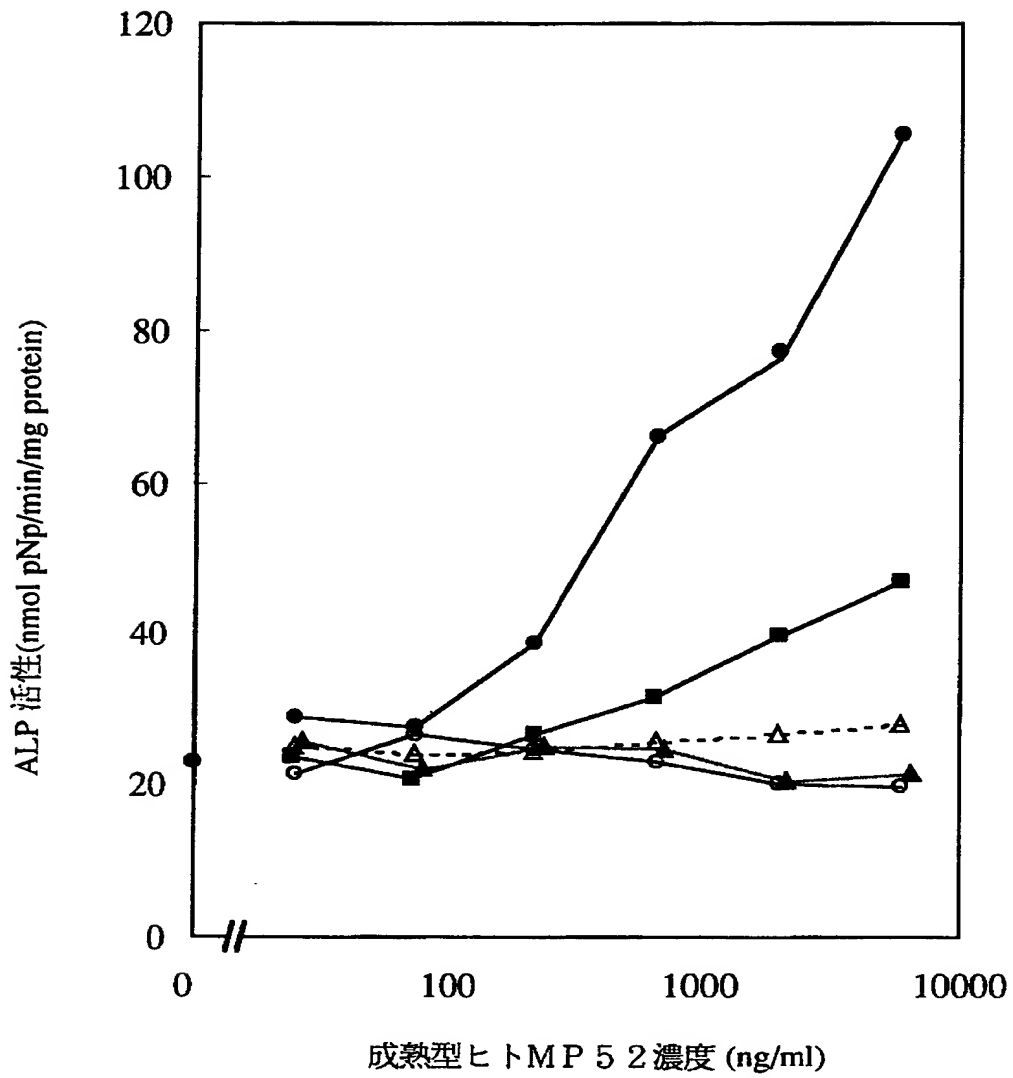
MC3T3-E1細胞株中のALPase活性について、逆相HPLCにおける保持時間の違うメチオニン残基をアルキル化した成熟型ヒトMP52の各分画と未修飾成熟型ヒトMP52の逆相分画とを比較した図である。図中の黒丸実線は未修飾成熟型ヒトMP52の逆相分画を、黒四角実線は1個のメチオニン残基がアルキル化されたもの、黒三角破線は2個のメチオニン残基がアルキル化されたものを、白抜き丸実線は3個のメチオニン残基がアルキル化されたものを、白抜き三角点線は4個のメチオニン残基がアルキル化されたものをそれぞれ表わしている。X軸の0上に示してある黒丸は、薬物を添加していない細胞の活性を示している。

## 【図 2】

細胞株の違いによるメチオニン残基を酸化した成熟型ヒトMP52およびトリプトファン残基をアリールスルフェニル化した成熟型ヒトMP52のアンタゴニスト様活性を示した図である。(A)は、C3H10T<sup>1/2</sup>細胞株における成熟型rh-BMP-2に対するアンタゴニスト様活性、(B)は、MC3T3-E1細胞株における成熟型ヒトMP52に対するアンタゴニスト様活性をそれぞれ表わしている。図中における黒丸実線トリプトファン残基をアリールスルフェニル化した成熟型ヒトMP52を、白抜き丸点線はメチオニン残基を酸化した成熟型ヒトMP52を、黒四角は(A)ではメチオニン残基を酸化した成熟型ヒトMP52未添加の300ng/mlの成熟型rh-BMP-2単独のALPase活性(C3H10T<sup>1/2</sup>細胞株)、(B)では600ng/mlの未修飾成熟型ヒトMP52単独のALPase活性(MC3T3-E1細胞株)を示す。また、白抜き四角は薬物未添加の活性を示している。

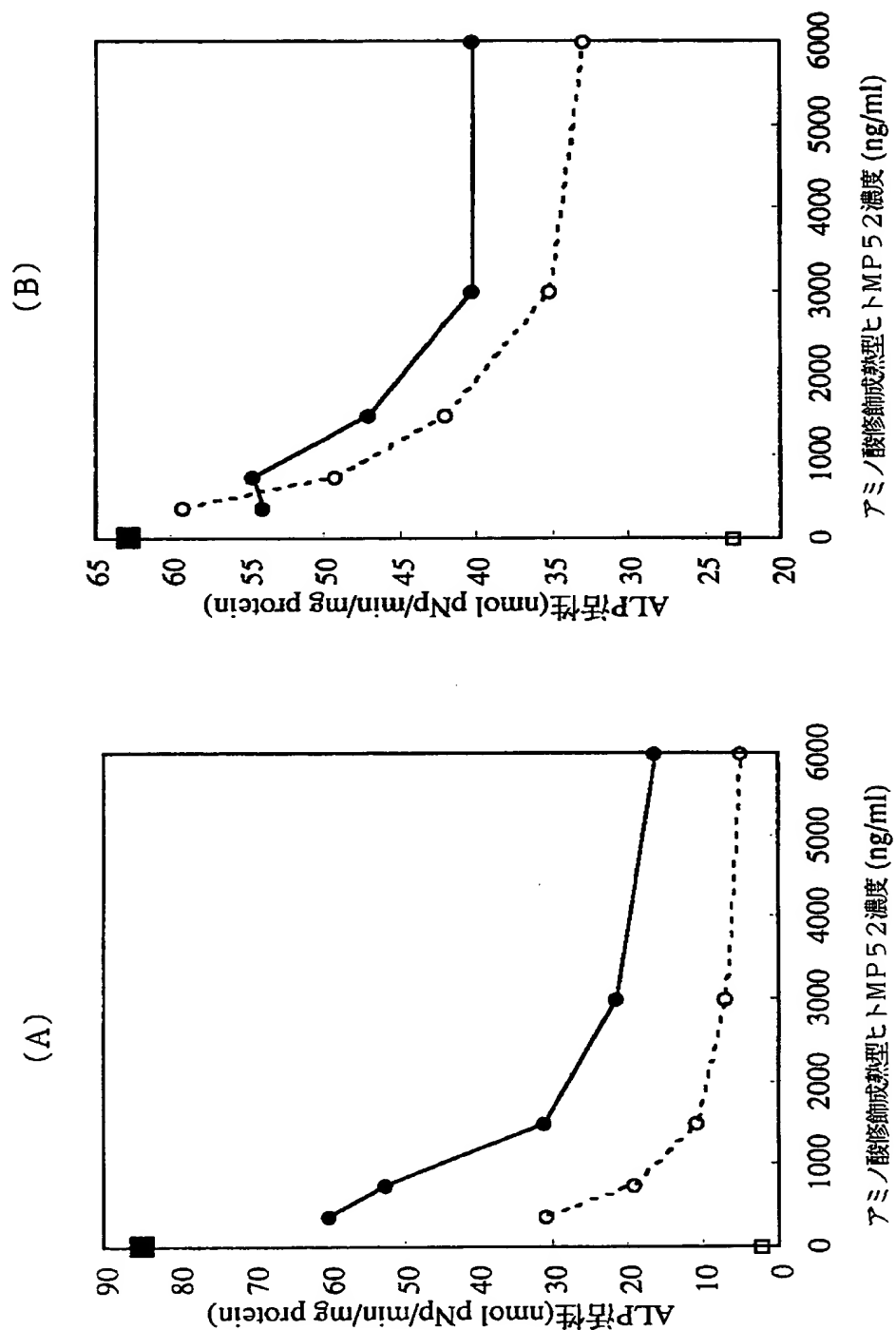
【書類名】 図面

【図 1】





【図 2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 骨誘導因子に対して拮抗作用を有する成熟型蛋白質を提供する。

【解決手段】 骨誘導因子アンタゴニスト活性を有する成熟型蛋白質は、成熟型ヒトMP52のアミノ酸配列中に存在するメチオニン残基もしくはトリプトファン残基のうちの少なくとも1個の残基を化学修飾により親水性残基に変換するか、あるいは該残基を親水性アミノ酸残基もしくは極性アミノ酸残基で置換することにより得られる。前記メチオニン残基の化学修飾は酸化またはアルキル化により行われる。前記トリプトファン残基の化学修飾はアリールスルフェニル化により行われる。

あるいは骨誘導因子アンタゴニスト活性を有する成熟型蛋白質は、成熟型ヒトBMP-2、成熟型ヒトBMP-4または成熟型ヒトBMP-7のアミノ酸配列中に存在するトリプトファン残基の少なくとも1個の残基を、化学修飾により親水性残基に変換するか、あるいは該残基を親水性アミノ酸残基もしくは極性アミノ酸残基で置換することにより得られる。さらに、成熟型ヒトBMP-2、成熟型ヒトBMP-4または成熟型ヒトBMP-7のアミノ酸配列において、その受容体結合部位を構成する疎水性アミノ酸残基のうち、成熟型ヒトMP52のアミノ酸配列の30番目、71番目および74番目に位置するメチオニン残基に相当する位置の3個の疎水性アミノ酸残基のうち少なくとも1個のアミノ酸残基を親水性アミノ酸残基もしくは極性アミノ酸残基で置換することによっても得られる。

得られた成熟型蛋白質は異所性骨化石灰沈着を伴う代謝性疾患の治療または予防剤として有用である。さらに骨誘導因子とその受容体の結合に競合する薬物のスクリーニングや評価系における試薬としても有用である。

【選択図】 なし

【書類名】  
【訂正書類】

職権訂正データ  
特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 596124690

【住所又は居所】 東京都港区赤坂二丁目17番51号

【氏名又は名称】 ヘキスト・マリオン・ルセル株式会社

【代理人】 申請人

【識別番号】 100091731

【住所又は居所】 東京都千代田区麹町一丁目10番地 麹町広洋ビル  
すばる特許事務所

【氏名又は名称】 高木 千嘉

【選任した代理人】

【識別番号】 100080355

【住所又は居所】 東京都千代田区麹町一丁目10番地 麹町広洋ビル  
すばる特許事務所

【氏名又は名称】 西村 公佑

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [596124690]

1. 変更年月日 1998年 1月26日  
[変更理由] 名称変更  
住 所 東京都港区赤坂二丁目17番51号  
氏 名 ヘキスト・マリオン・ルセル株式会社